

る Ahr 系について検討した。Ahr はリガンドと結合すると aryl-hydrocarbon receptor-inter acting protein (AIP)や HSP90 と複合体を形成し、核内に移行する。核内に移行した Ahr は aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (Arnt)とヘテロダイマーを形成し、Cyp1a1, Cyp1a2, Cyp1b1, Ahrr 等の遺伝子の dioxin response element (DRE)に結合し、転写を促進する。発現が誘導された Ahrr は Arnt とヘテロダイマーを形成し、DRE に結合し、Ahr/ Ahnt ヘテロダイマーによる転写の活性化を阻害するネガティブフィードバックを構成する。Cyp1a1 等の遺伝子発現を検討したところ、Cyp1a1 は TCDD により、2 時間から濃度依存的な誘導がみられ、8 時間後に発現量は低用量でも飽和に達し、24 時間までその誘導状態が持続した。ダイオキシン類である TCDD 及び TCDF はその毒性等価係数(TEF)に従い、誘導にはほぼ 10 倍の開きがみられた。しかし、3-MC は TCDD と同様に 2 時間から濃度依存的な誘導がみられたが、8 時間後に発現はピークを示し、24 時間後には発現の低下がみられた。Indigo は 4~8 時間後に発現のピークを示し、24 時間後には元のレベルに戻った。これは吸収・代謝・排泄などによる化学物質の濃度を反映していると考えられる。さらに、同様に Ahr を介して誘導される Cyp1a2 は 3-MC、Indigo とともに 24 時間後まで発現誘導が認められた。Ahr を介して発現が誘導される代謝酵素である Cyp1a1 と Cyp1a2 の誘導パターンが異なることは、遺伝子発現カスケードを考える上で非常に重要であり、今後更に解析を続ける。

早期に誘導・抑制が起こる遺伝子群につ

いて検討した結果、2, 4 時間と早期に発現のピークを迎える遺伝子として Serpine1, EST (AW558171), Hnf4, Oncogene-related (OR), Rassf1, Sap30, Txnip, Zfp3611, Gadd45b, Nfe2l2 の 10 遺伝子を報告したが、特に OR, Rassf1 は 2 時間に激しく誘導された後、4 時間後には定常レベルに回復した。マウスにおける TCDD の半減期は 11~24 日と報告されており、本実験中肝臓は常に TCDD の刺激を受け続けていると考えられる。しかし、一度誘導を受けた後、その発現が減少する遺伝子が複数観察された。このような現象は、なんらかのネガティブフィードバック機構が働いているために起こると考えられた。これらの遺伝子の多くが、他の 3 種類の Ahr 作動性化学物質においても観察された。今後、これらの遺伝子についてプロモーター解析等の解析手法を組み合わせることで、恒常性維持機構に関連する遺伝子群の制御回路の更なる解明を進める。

(2) 恒常性維持に関わるエピジェネティック制御機構障害の神経幹細胞をモデルにした研究

我々のこれまでの検討により、脱メチル化剤である AzaC は、神経幹細胞のニューロン分化を促進すること、遺伝子発現レベルでも、未分化性維持に必須な Hes5 の発現を低下させ、ニューロン分化を引き起こす NeuroD の発現を上昇させることが明らかとなった。一方で、サイクリン D1 などの E2F 標的遺伝子群の発現を増加させ、スフェアの構成細胞の少なくとも一部では細胞増殖を促進しているらしいことも明らかとなった。

(3) 発がんプロモーション過程の甲状腺・自律性差の解析

本年度は、甲状腺二段階発がんモデルを用いた4週間の動物実験を終了し、病理組織学的検索の結果、KA投与4週目において、0.5%以上の群で明らかな発がんプロモーション作用が確認され、遺伝子発現解析の緒につくことができた。予備的な検討の結果、発がん過程に関与せず甲状腺機能低下のみに関連する遺伝子群を得ることができた。強く発現変動するものの中には甲状腺を含む内分泌機能に深く関わる遺伝子が多く見出され、KA投与による甲状腺機能低下症に関連すると考えられる複数の新規遺伝子を見出した。引き続き、イニシエーション特異的な遺伝子及びKA投与による甲状腺機能減少に関連する遺伝子を除外することにより、KAによる甲状腺発がん過程の早期に特異的な遺伝子発現プロファイルを検索する予定である。さらに、発現の用量に関連した発現変動を重視して選別を加えることにより、より注目すべき遺伝子群の絞り込みを行う。今後は、KA投与後10あるいは15週で発生した腺腫、腺がんとその周囲組織での発現遺伝子のプロファイルを、独自に開発したパラフィン包埋微量組織でのマイクロアレイ解析法を利用して求め、腫瘍性増殖形質の獲得に関与する遺伝子群の同定を進める。また、今回の結果をreal-time PCR法等で検証し、可能であれば細胞局在等の解析を進め、それらの発がんにおける役割について検討を進める。

E. 結論

(1) モデルとしてのアрил hidrocarbon 受容体(Aryl hydrocarbon receptor, Ahr) 作

動性化学物質暴露時における恒常性維持機構に関連する遺伝子群に関する研究

“Percellome”手法を適用した濃度・時間的な遺伝子発現誘導を検討した結果、恒常性維持に関与すると考えられる遺伝子群の発現誘導を確認できた。今後更にプロモーター解析等各種解析を組み合わせることにより、恒常性維持機構に関連する遺伝子群の制御回路の解明が進むことが期待される。

(2) 恒常性維持に関わるエピジェネティック制御機構障害の神経幹細胞をモデルにした研究

これらの結果は、化学物質によりエピジェネティック制御機構を破綻させると、神経幹細胞には複雑な変化が惹起されること示唆するものである。DNAメチル化機構に影響を与えることが示唆されている化合物は、砒素化合物や高用量のDESなど、その報告は限られている(図2-8)。

図2-8 エピジェネティック作用を有するとされる化合物例

化学物質名	作用		
	メチル化促進	脱メチル化促進	アセチル化促進
5-アザシチジン	×	○	×
ヒ素	○	○	×
ニッケル	○	×	×
Procainamide	×	○	×
Procaine	×	○	×
Valproic acid	×	×	○
Trichostatin A	×	×	○

こんなに少ないのか?

この一つの理由として何らかの細胞機能を指標としたDNAメチル化修飾機構の有無をスクリーニングする良い系が存在しないことが挙げられる(メチル化感受性制限酵

素や PCR 等によるスクリーニングは行われている)。今回示した様な網羅的遺伝子発現解析のデータベース化が、この様な毒性メカニズム解析の洗い出しにも有効性を示すことが期待される。

(3) 発がんプロモーション過程の甲状腺・自律性差の解析

ラット二段階甲状腺発がんモデルを用いて、KA の 4 週間投与による発がん実験を終了した。予備的な検討の結果、KA 投与に起因した甲状腺機能低下に関連する複数の遺伝子の発現変動を確認し、今後の発がん過程特異的な遺伝子群を得るための条件が整った。これにより、局所恒常性維持機構に関する情報を得る方策への展開が期待される。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Takahashi Y, Kitajima S, Inoue T, Kanno J, Saga Y. Differential contribution of Mesp1 and Mesp2 to the epithelialization and rostro-caudal patterning of somites. *Development*, 132, 787-796, 2005

Ishikawa A, Kitajima S, Takahashi Y, Kokubo H, Kanno J, Inoue T, Saga Y. Mouse Nkd1, a Wnt antagonist, exhibits oscillatory gene expression in the PSM under the control of Notch signaling. *Mech Dev*. 2004 Dec;121(12):1443-53.

Hirabayashi Y, Yoon BI, Li GX, Kanno J, Inoue T. Mechanism of benzene-induced hematotoxicity and leukemogenicity: current review with implication of microarray analyses. *Toxicol Pathol*. 2004 Jul-Aug;32 Suppl 2:12-6.

Fujimoto N, Igarashi K, Kanno J, Honda H, Inoue T. Identification of estrogen-responsive genes in the GH3 cell line by cDNA microarray analysis. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2004 Jul;91(3):121-9.

Tsuboi I, Morimoto K, Hirabayashi Y, Li GX, Aizawa S, Mori KJ, Kanno J, Inoue T. Senescent B lymphopoiesis is balanced in suppressive homeostasis: decrease in interleukin-7 and transforming growth factor-beta levels in stromal cells of senescence-accelerated mice. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2004 Jun;229(6):494-502.

Nagao T, Wada K, Kuwagata M, Nakagomi M, Watanabe C, Yoshimura S, Saito Y, Usami K, Kanno J. Intrauterine position and postnatal growth in Sprague-Dawley rats and ICR mice. *Reprod Toxicol*. 2004 Jan-Feb;18(1):109-20.

Yoon BI, Hirabayashi Y, Kawasaki Y, Tsuboi I, Ott T, Kodama Y, Kanno J, Kim DY, Willecke K, Inoue T. Exacerbation of benzene pneumotoxicity in connexin 32 knockout mice: enhanced proliferation of CYP2E1-immunoreactive alveolar epithelial cells. *Toxicology*. 2004 Jan

15;195(1):19-29.

菅野 純、相崎健一、五十嵐勝秀、小野 敦、中津則之、トキシコゲノミクス、ゲノム研究実験ハンドブック、p329-337 実験医学別冊 2004

菅野 純、相崎健一、五十嵐勝秀、小野 敦、中津則之 ゲノム毒性学形質非依存型トキシコゲノミクスの導入、細胞工学 Vol.23 No.6 2004685-693、株式会社秀潤社

菅野 純：医薬品開発におけるわが国のトキシコゲノミクスの取り組み、月刊薬事、2004年5月、Vol.46, No.6 株式会社じほう

菅野 純：化学物質の毒性 化学と教育 52 巻 5 号『化学物質とリスク評価』2004年 302-305 (社)日本化学会

2. 学会発表

Jun Kanno, Screening/Testing Scheme for Endocrine Disrupting Chemicals, 19th Scientific Meeting of the Malaysian Society of Pharmacology and Physiology (MSPP), May17-18, 2004, Malaysia

Jun Kanno, Endocrine Disrupting Chemicals Researches, Current Topics, 19th Scientific Meeting of the Malaysian Society of Pharmacology and Physiology (MSPP), May17-18, 2004, Malaysia

菅野 純 「前向き」 Toxicogenomics、

第 88 次日本法医学会総会、2004 年 6 月 2~4 日、旭川

高橋 雄、北嶋 聡、菅野 純、相賀裕美子、「Notch リガンド D113 は Mesp2 の欠損による体節形成と前後パターン形成の異常を回復する」、日本発生生物学会第 37 回大会、2004 年 6 月 4~6 日、名古屋

平林容子、壺井 功、菅野 純、井上 達、「造血器における細胞間ギャップ結合の病理-コネクシン欠失による造血障害と実験白血病高甘感受性について-」、第 93 回日本病理学会総会、2004 年 6 月 9~11 日、札幌

J Kanno, K Aisaki, A Ono, N Nakatsu, Y Kodama, K Igarashi , PHENOTYPE-INDEPENDENT TOXICOGENOMICS USING "PERCELLOME" AND "MILLE-FEUILLE" DATA SYSTEM, 第 31 回日本トキシコロジー学会学術年会 (特別講演)、2004 年 7 月 6~8 日、大阪

中津則之、相 健一、五十嵐勝秀、小野敦、北嶋聡、児玉幸夫、菅野純、「日内変動遺伝子群プロファイルの解析」 第 31 回日本トキシコロジー学会学術年会 (口演)、2004 年 7 月 6~8 日、大阪

J Kanno, K Aisaki, A Ono, K Igarashi , TOXICOGENOMICS USING "PERCELLOME"

AND "MILLE-FEUILLE" DATA
SYSTEM, 10th International Congress of
Toxicology, 11-15 July, 2004; Tampere,
Finland

鈴木孝昌、Palanisamy Rajaguru、小原
有弘、本間正充、林 真、高木篤也、
菅野 純、「GeneChip による遺伝子発
現解析を用いてアリストロキア酸によ
る遺伝子傷害の臓器特異性を予測可能
か Use of the gene expression analysis by
the GeneChip for a prediction of the target
organs in Aristolochic acid-induced
genotoxicity in mice.」第 63 回日本癌学
会学術総会、2004 年 9 月 29 日～10 月
1 日、福岡

菅野 純、藤井寿一、菅野 仁、相
健一、「解糖系障害で誘導される赤芽
球アポトーシスと p53 の関連、p53
involvement in glycolysis disorder-induced
apoptosis of erythroid cell」第 63 回日本
癌学会学術総会、2004 年 9 月 29 日～10
月 1 日、福岡

Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Katsuhide
Igarashi, Noriyuki Nakatsu, Atsushi Ono,
Yukio Kodama "Percellome" Analysis of
Hormonally Active Compounds.
Toxicogenomics International Forum 2004,
12-13 October, 2004

五十嵐勝秀、高橋芳樹、菅野 純、内分
泌かく乱化学物質の胎児神経幹細胞に対
する作用、第 27 回日本分子生物学会年
会、2004 年 12 月 8 日～12 月 11 日、神

戸

中津則之、相 健一、小野 敦、五十嵐
勝秀、児玉幸夫、菅野 純、マウス肝
臓におけるダイオキシン類による遺伝子
発現変動解析、第 27 回日本分子生物学
会年会、2004 年 12 月 8 日～12 月 11 日、
神戸

椎名博子、佐藤隆史、五十嵐勝秀、松本
高広、宮本純子、高田伊知郎、中村貴、
盛真友、菅野純、吉川裕之、加藤茂明、
アンドロゲン受容体は卵胞発育必須因子
である、第 27 回日本分子生物学会年会、
2004 年 12 月 8 日～12 月 11 日、神戸

高橋芳樹、五十嵐勝秀、菅野 純、マウ
ス胎児神経幹細胞の維持における DNA
メチル化の役割、第 27 回日本分子生物
学会年会、2004 年 12 月 8 日～12 月 11
日、神戸

渡辺裕介、小久保博樹、宮川-富田幸子、
五十嵐勝秀、菅野純、相賀裕美子、マウ
ス心臓における Notch1 シグナリングの機
能解析、2004 年 12 月 8 日～12 月 11 日、神
戸

Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Katsuhide
Igarashi, Noriyuki Nakatsu, Atsushi Ono,
Yukio Kodama, "Percellome" method
application to the analysis of hormonally
active compounds and its possible
contribution to the ecotoxicogenomics. 環境
ホルモン学会第 7 回研究発表会、2004 年
12 月 15 日、名古屋

H. 知的財産所有権の出願・登録状況（予定も含む）

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
国内特許申請中(特願2003-317031、
特願2004-219285)

恒常性維持に関わる
エピジェネティック制御機構障害の
神経幹細胞をモデルにした研究

菅野 純
国立衛研・毒性部

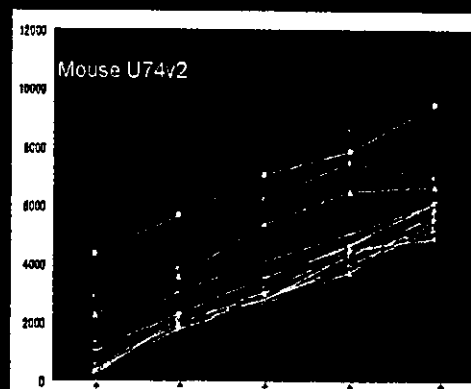
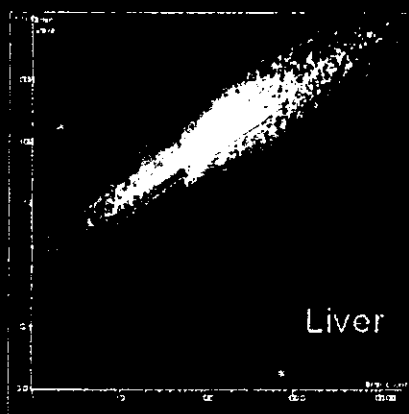
発表内容

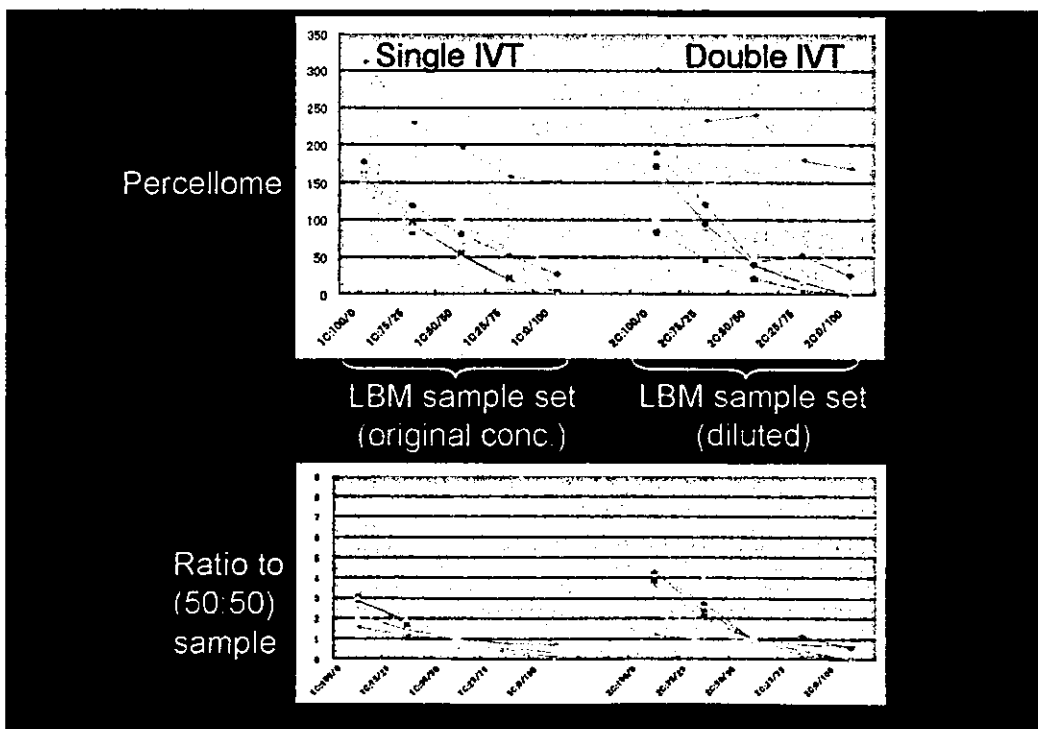
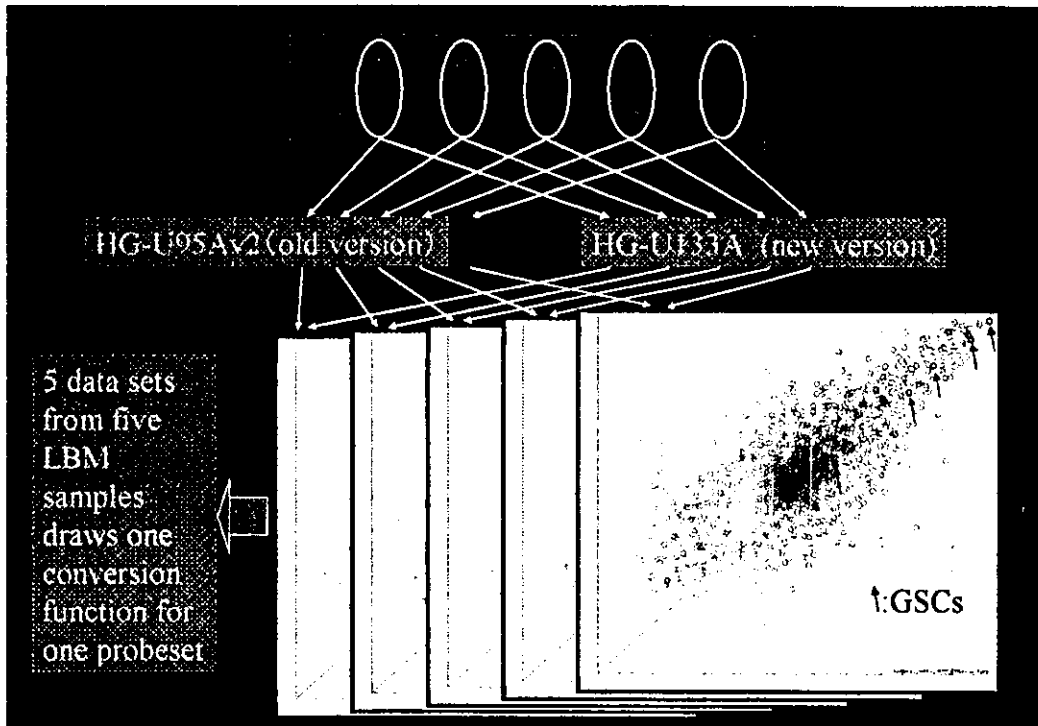
- Percellome展開の概要
- 恒常性維持機構:背景研究
 - 内分泌かく乱化学物質の神経系初期発生に対する影響
- 恒常性維持機構研究
 - エピジェネティック制御機構障害の神経幹細胞をモデルにした研究

大型データベース・コンソーシアム構築のための Percellomeによるデータ互換の促進

- Percellomeによるデータ互換が可能と成るマイクロアレイ・PCRの条件
 - GSCを受け入れる
 - 直線性の良い用量相関性があること
 - 用量相関性が広いレンジで見られること
- LBM データを基に変換関数が求まる
 - 再計算が容易
- 現状
 - CodeLink マイクロアレイ
 - Agilent 単色マイクロアレイ
 - GeneChip の新旧バージョン間
 - IVTの1回増幅と2回増幅の間
 - Quantitative PCR (SYBRGreen)

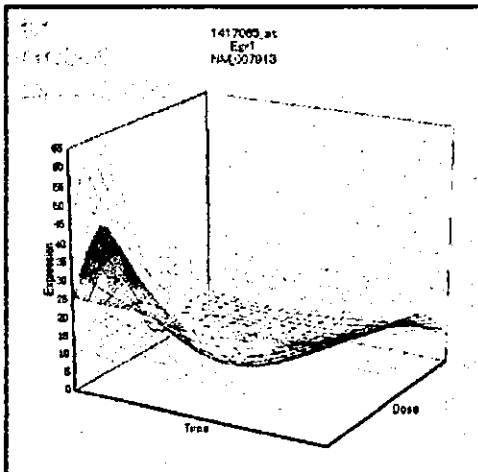
LBM (Liver-Brain-Mix) for verification of Dose-response capability of the system



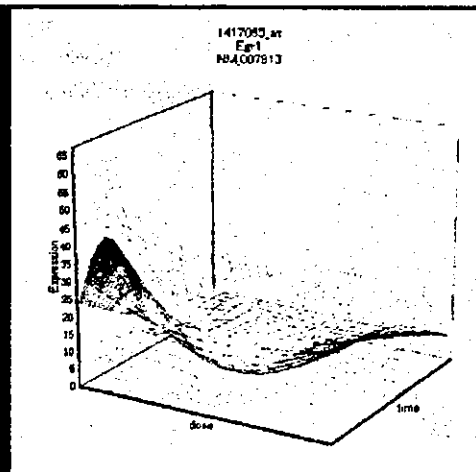


Percellome Q(RT)-PCR protocol

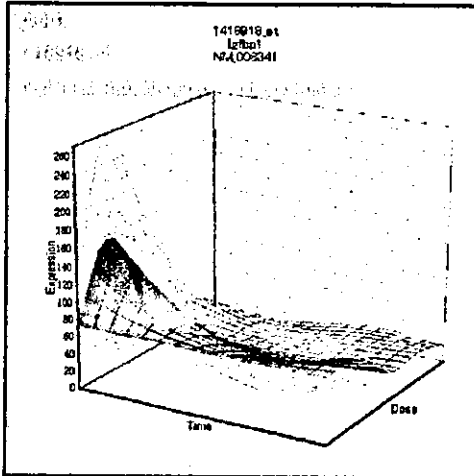
- DNase treatment
 - Enzyme: DNaseI (amplification grade, Invitrogen)
 - Reaction: 15min (room temperature)
- RT
 - Enzyme: SuperScript II (Invitrogen)
 - Reaction: 50min (42 C)
- real time PCR
 - Apparatus: 7900HT (ABI)
 - Chemistry: SYBR Green
 - Enzyme: SYBR Premix Ex Taq (ROX, Takara)
 - Reaction:
 - 10 sec (95 C)
 - 5 sec (60 C)
 - 60 sec (95 C)



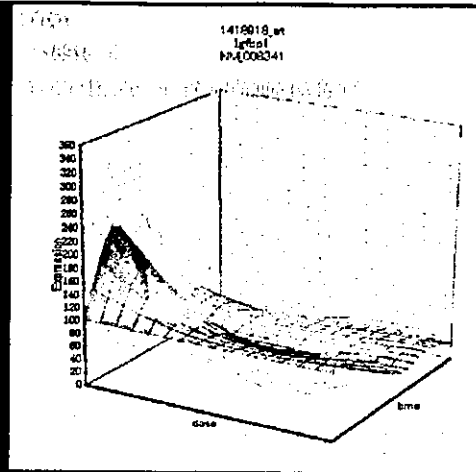
Quantitative PCR



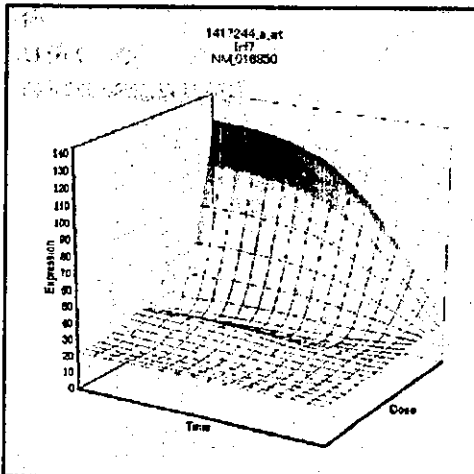
GeneChip



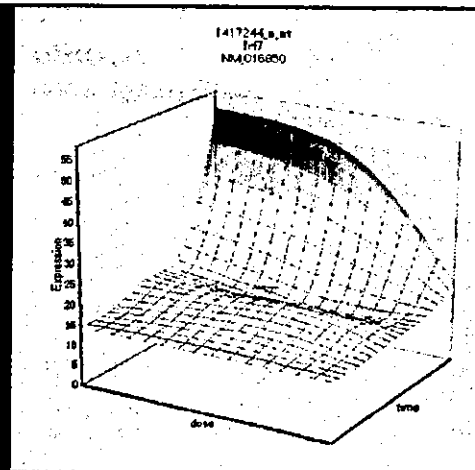
Quantitative PCR



GeneChip



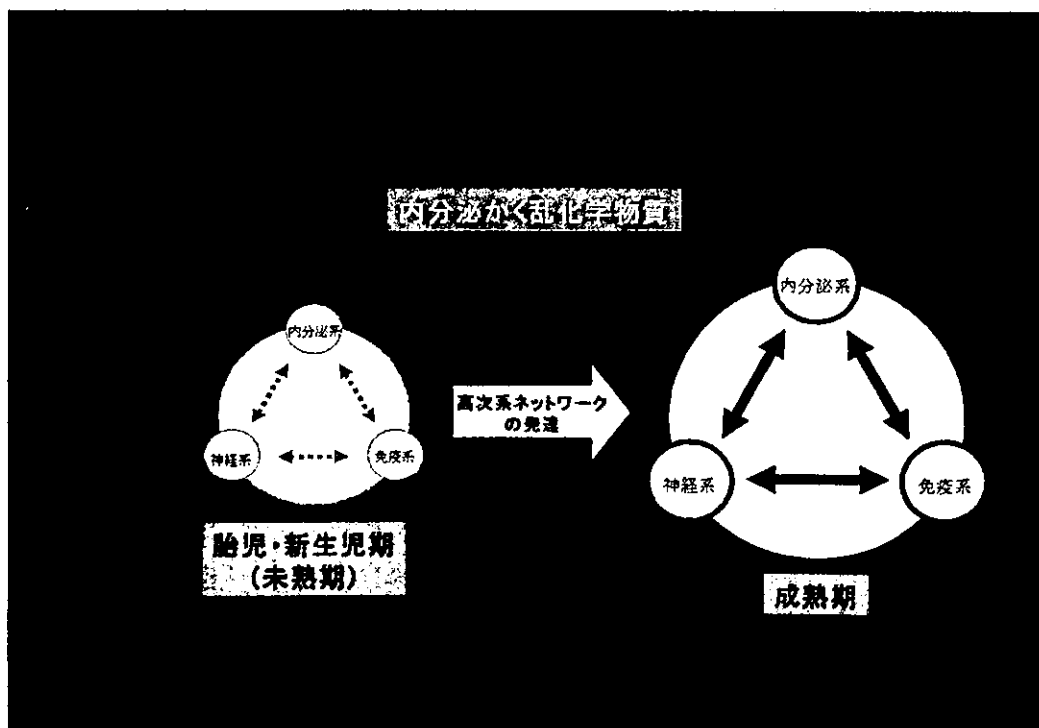
Quantitative PCR



GeneChip

- 恒常性維持機構: 背景研究

- 内分泌かく乱化学物質の神経系初期発生に対する影響



背景

神経系初期発生に対する影響を明らかにする。

→ 「受容体毒性」(有害作用)の基礎解析

【例: 器官形成開始後にエストロゲン受容体(ER)が最も早く発現し始める臓器=脳】

中枢神経の発生ステップ(哺乳類)

- | | |
|-------|--------------------------------|
| 発生初期 | (1) 神経誘導(神経板・神経管の形成) |
| | (2) 神経幹細胞の増殖・領域特異化 |
| 発生中期 | (3) ニューロンの分化・移動
(プロジェニター分化) |
| 発生後期 | (4) グリア分化と層構造・神経核の構築 |
| 生後発達期 | (5) 軸索伸長・特異的標的認識・シナプス形成 |
| | (6) シナプスの電氣的活動、可塑性 |

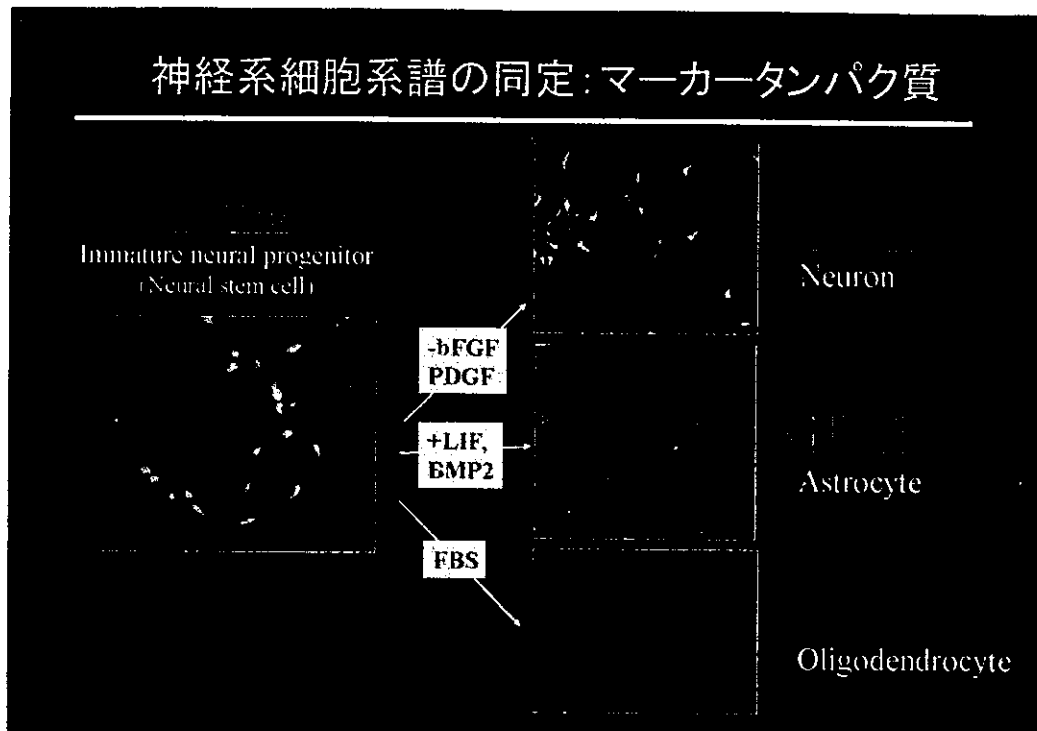
中枢神経の発生ステップ (哺乳類)

- | | |
|-------|-------------------------|
| 発生初期 | ① 神経誘導 (神経板・神経管の形成) |
| 発生中期 | ② 神経管の閉鎖・神経管の分化・神経細胞の発生 |
| 発生後期 | ③ ニューロンの分化・移動 |
| 生後発達期 | ④ グリア分化と層構造・神経核の構築 |
| | ⑤ 軸索伸長・特異的標的認識・シナプス形成 |
| | ⑥ シナプスの電気的活動、可塑性 |

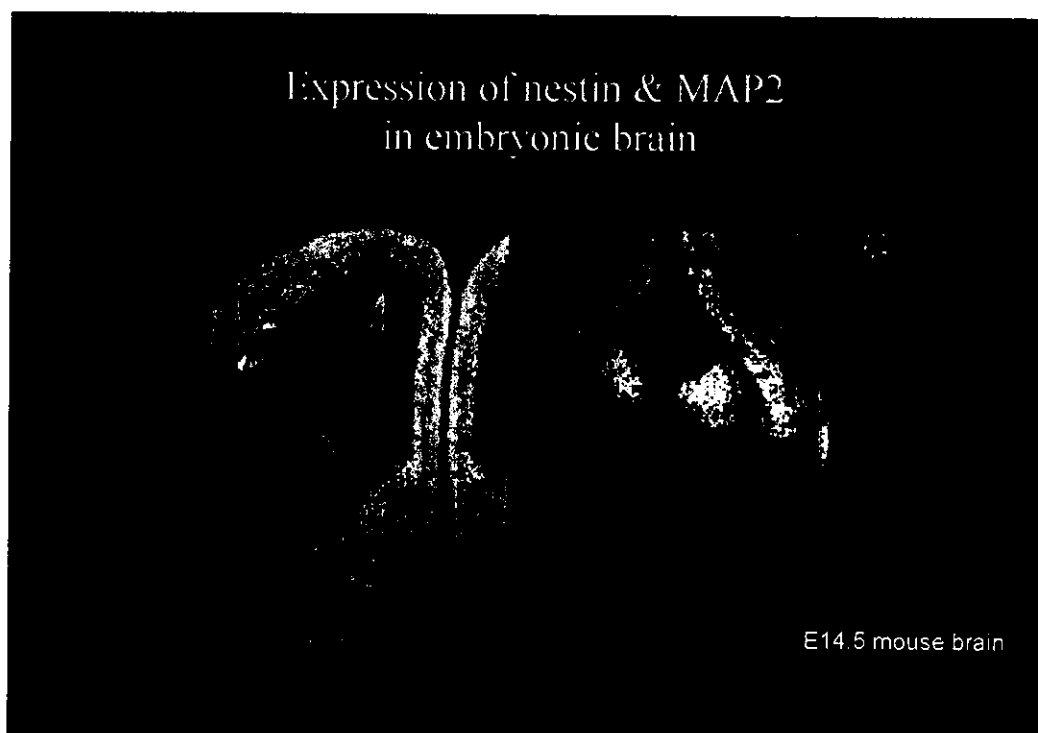
背景研究

1. 胎児期 *in utero* の神経幹細胞に対する影響
• *In utero* DES effect to Neural stem cell (NSC)
 - i. Neurosphere (NS) formation
 - ii. Differentiation analysis
 - iii. Genechip analysis
2. 胎児期神経幹細胞における *in vitro* の発現
3. *Ex vivo* NS versus *in vivo* Brain

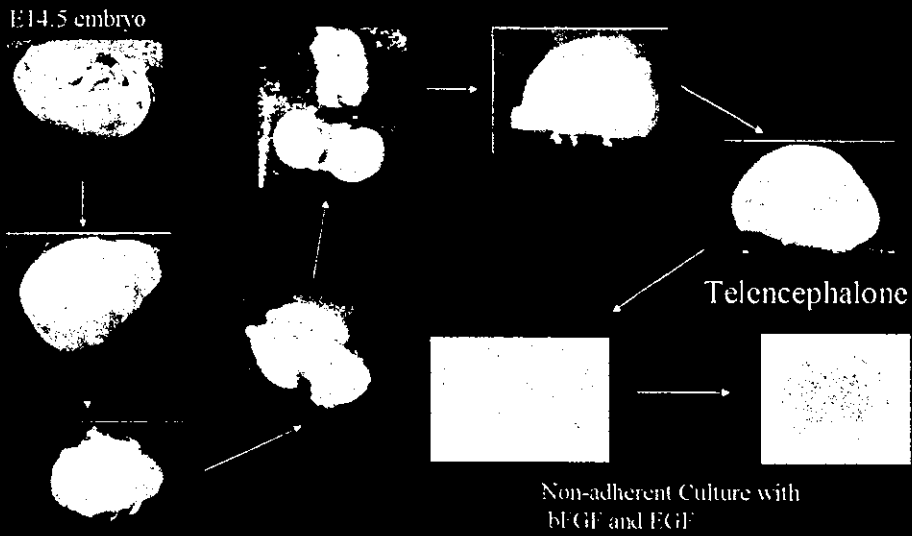
神経系細胞系譜の同定: マーカータンパク質



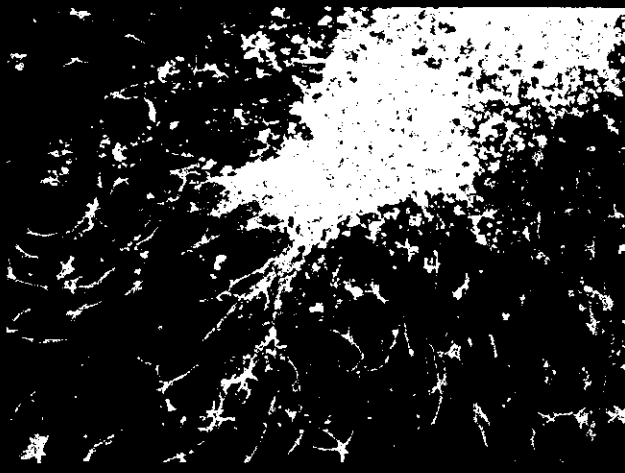
Expression of nestin & MAP2 in embryonic brain



Procedure for embryonic neurosphere culture



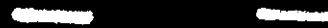
Cells in NS can differentiate to neuron, astrocyte & oligodendrocyte



Green: MAP2 Red: GFAP Light blue: O4

Expression of ER α , β mRNA in neurosphere cells

Primer	ER α		ER β	
	+	-	+	-
RT	+	-	+	-

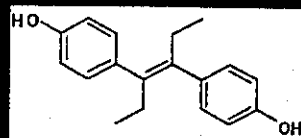


In utero exposure Experiment

Model compound/ dose/ route

DES (Diethylstilbestrol)

0.02, 0.2, 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$, sc/dam body weight



Exposure period

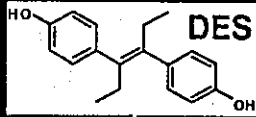
E11.5-14.5

Culture (sampled at E14.5)

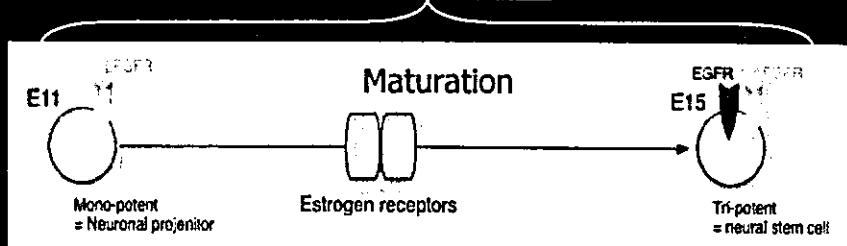
Embryonic telencephalon Neurosphere

作用モデル:

1. NSC の「成熟」の概念とその過程への影響の解析
2. Stem cell の 自己複製と分化への影響の解析



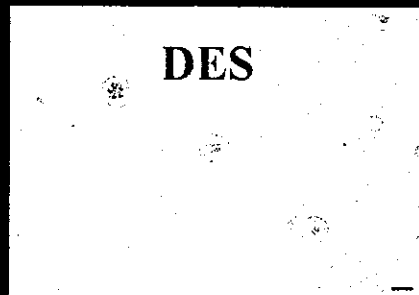
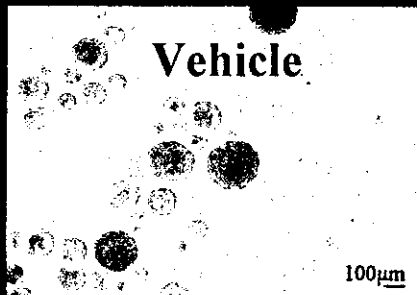
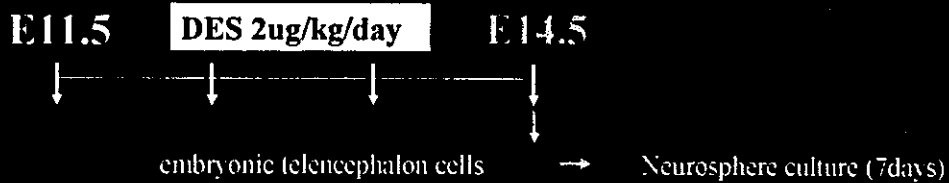
エストロゲン応答遺伝子群
の発現変化を第一指標として解析



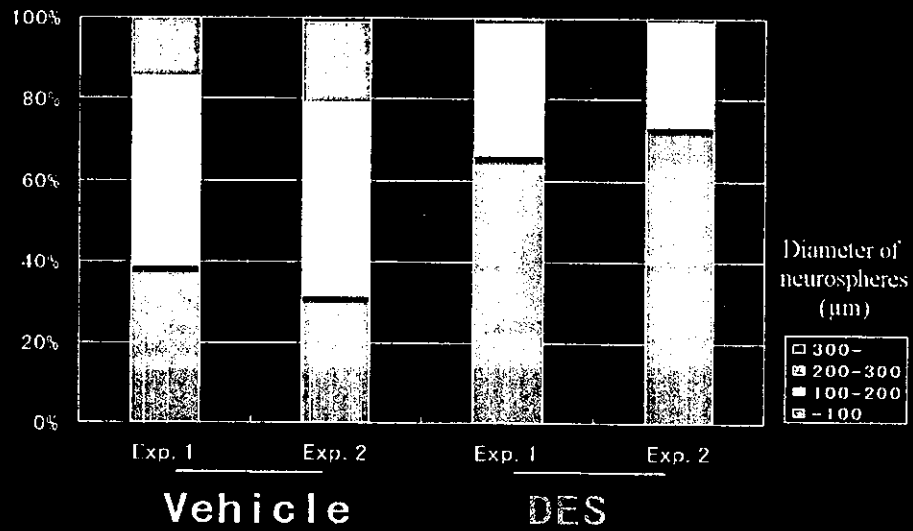
自己複製能
分化能(mono)

自己複製能
分化能(tri)

In utero DES treatment affects the formation of embryonic Neurospheres

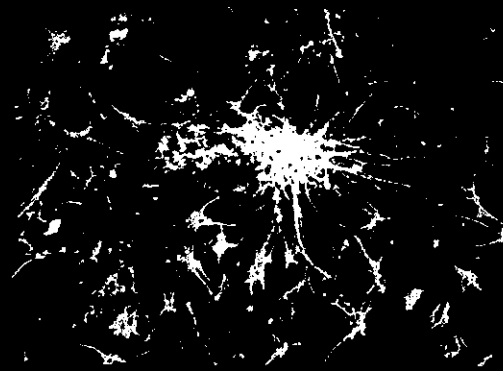


Effect of DES to the size distribution of Neurosphere



Differentiation assay

Protocol:
 1. Transfer neurospheres (NS) to 96-well plates (1 NS/well)
 2. Culture with 1% FBS for 7 days
 3. Immunofluorescence staining
Antibody: MAP2, GFAP-Cy3, O4
 4. Components analysis

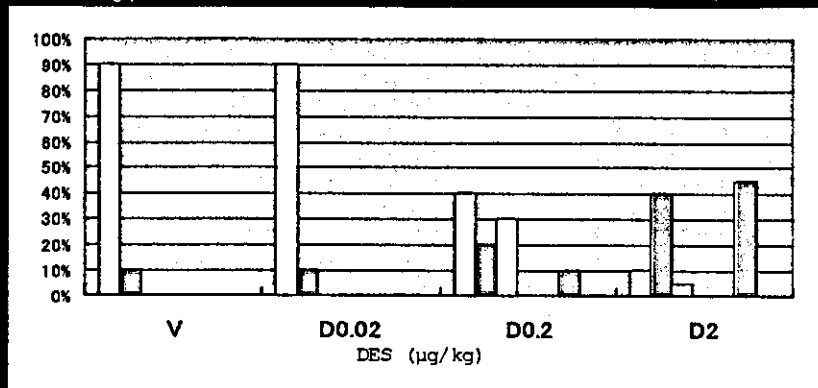


Vehicle
 Component: IAG (MAP2⁺, GFAP⁺, O4⁺)

In utero DES exposure affects neural stem cell multi-potency

Component analysis

Marker	NAO	NO	NA	NO	N	NA
MAP2	+	-	+	+	+	-
GFAP	+	+	+	-	-	+
O4	+	+	-	+	-	+



- Neuron への分化の抑制
- Glia 細胞系への分化の保持
- Nestin陽性細胞の自己複製の低下